

**ZELLMEMBRANUNTERSCHIEDE ZWISCHEN
MALIGNEN UND NICHT-MALIGNEN ZELLEN**

Jutta Brosse

1985

*Gess
München*

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Spiess

ZELLMEMBRANUNTERSCHIEDE ZWISCHEN MALIGNEN UND NICHT-
MALIGNEN ZELLEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jutta Brosse
aus
München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Rabes
Prof. Dr. med. R. Hartenstein

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Februar 1986

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Zellmorphologie bei malignen Tumoren	1
2.	Histologisches Bild bei ALL	2
3.	Zielsetzung	3
II.	Ergebnisteil	4
1.	Material und Methoden	4
2.	Ergebnisse	6
III.	Diskussion	13
1.	Struktur des Heparin	13
2.	Die Zellelektrophorese	13
2.1.	Theoretische Grundlagen, Versuchsanordnung	14
2.2.	Elektrophoretische Beweglichkeit maligner Zellen und gesunder Vergleichszellen	16
2.3.	Elektrophoretische Beweglichkeit gesunder Blutzellen	16
2.3.1.	Erythrocytenbeweglichkeit	16
2.3.2.	Leukocytenbeweglichkeit	17
2.3.3.	Beweglichkeit von Sternalmarkzellen	19
2.4.	Elektrophoretische Beweglichkeit von Leukämiezellen	19
2.4.1.	Chronisch myeloische Leukämie	19
2.4.2.	Chronisch lymphatische Leukämie	20
2.4.3.	Akute myeloische Leukämie	23
2.4.4.	Akute lymphatische Leukämie	24
2.5.	Vergleich mit eigenen Ergebnissen	29
3.	Die Neuraminsäure	30
3.1.	Chemische Struktur, Einbau, Abbau	31
3.2.	Neuraminsäuregehalt gesunder und maligner Zellen	32
3.3.	Neuraminsäurespiegel im Serum Tumorkranker	35

3.4. Sialyltransferaseaktivität im Serum Tumorkranker	39
3.5. Neuraminsäuregehalt gesunder und maligner Blutzellen	40
3.5.1. Gesamter Neuraminsäuregehalt	40
3.5.2. Neuraminsäuregehalt der Zelloberfläche	41
3.6. Neuraminsäuregehalt in Oberflächen-glykoproteinen	43
3.7. Vergleich mit eigenen Ergebnissen	44
IV. Zusammenfassung	46
V. Literaturverzeichnis	47

I. Einleitung

1. Zellmorphologie bei malignen Tumoren

Besteht aufgrund von Anamnese und klinischen Befunden bei einem Patienten der Verdacht auf einen malignen Tumor, so muß die Diagnose mit Hilfe einer histologischen Untersuchung des makroskopisch veränderten Gewebes gesichert werden. Neben dem für bösartige Tumoren charakteristischen infiltrativen, das umgebende Gewebe destruierenden Wachstum bietet sich hierfür eine Reihe morphologischer Kriterien an, die bei mikroskopischer Betrachtung der Zellen im Vergleich mit dem gesunden Ausgangsgewebe ihre Abstammung aus einer malignen Geschwulst mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nachweisen.

Zu diesen als Zellatypien bezeichneten Merkmalen zählen Veränderungen sowohl des Zellkerns als auch des Zytoplasmas. Oft besteht eine abnorme Kerngröße mit Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kerns; es finden sich stark wechselnde Kerngrößen, eine Vielfalt an Kernformen sowie vermehrte Mitosen, die auf ein rasches Tumorstadium hindeuten. Auch die vermehrt auftretenden Nukleolen weisen Abweichungen in Größe und Gestalt auf. Änderungen des Zytoplasmas führen sowohl zu wechselnder Zellgröße und -form als auch zu unterschiedlicher Anfärbbarkeit des Zytoplasmas.

Während die genannten Zellatypien bei Beurteilung vieler Zellen einen nahezu sicheren Malignitätsnachweis erbringen, kann es unmöglich sein, eine einzelne Zelle als eindeutig maligne einzustufen.

2. Histologisches Bild bei ALL

Der Verdacht auf Vorliegen einer akuten Leukämie ergibt sich, wenn ein Kind nach einem uncharakteristischen Krankheitsstadium mit allgemeiner Mattigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme Temperaturerhöhungen und eine vermehrte Neigung zu Infekten zeigt. Kommt es schließlich infolge der Verdrängung normaler Blutelemente zu einer hochgradigen Anämie sowie zum Auftreten petechialer und flächenhafter Haut- und Schleimhautblutungen und finden sich bei der körperlichen Untersuchung neben Leber- und Milzvergrößerung geschwollene Lymphknoten, so besteht klinisch an der Diagnose ALL kaum noch ein Zweifel.

Im Differentialblutbild findet sich ein wechselnd großer Anteil leukämischer Blasten, wobei die Gesamtleukocytenzahl erhöht sein kann, oft jedoch im Normbereich liegt oder sogar erniedrigt ist.

Die Sicherung der Diagnose erfolgt auch hier histologisch durch Untersuchung des Knochenmarks. Dieses zeigt eine uniforme Umwandlung durch den leukämischen Prozeß; die Zellen der Erythropoese, der Granulopoese sowie die Megakaryocyten sind stark zurückgedrängt. Die malignen Zellen selbst weisen alle Zeichen der Unreife auf. Ihr Zytoplasma ist stark basophil, der Plasmasaum schmal. Die Zellkerne sind groß, zum Teil unregelmäßig geformt und eingebuchtet, und enthalten oft mehrere Nukleolen.

Während die Diagnosestellung bei mikroskopischer Betrachtung des Knochenmarksausstriches meist keinerlei Schwierigkeiten bereitet, kann es aber auch hier unmöglich sein, eine einzelne Zelle als sicher maligne einzustufen. Die Frage nach der Malignität einer Einzelzelle kann sich jedoch als äußerst wichtig erweisen, wenn es darum geht,

den Erfolg einer chemotherapeutischen Behandlung zu beurteilen oder den Beginn eines Frührezidivs zu erkennen.

3. Zielsetzung

Eine Möglichkeit, eine bösartige Zelle auch dann als maligne zu erfassen, wenn morphologische Kriterien im Stich lassen, ergibt sich aus Unterschieden in der Membranbeschaffenheit gesunder und maligner Zellen.

In der folgenden Arbeit wird ein Verfahren beschrieben, das an einer Einzelzelle anhand ihres veränderten Oberflächenverhaltens einen Malignitätsnachweis ermöglicht.

Weiterhin soll mit Hilfe der Literatur über Oberflächeneigenschaften maligner Zellen versucht werden, Erklärungsansätze für das geänderte Verhalten der malignen Zelle zu entwickeln.

II. Ergebnisteil

Insgesamt wurden Blut- und Knochenmarkausstriche von 15 Patienten untersucht. Hierbei handelte es sich um 10 Kinder zwischen 3 und 11 Jahren mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), eine 60-jährige Frau mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL), 3 Kinder zwischen 1 und 10 Jahren mit Neuroblastom, bei denen die Erkrankung zu einer Infiltration des Knochenmarks geführt hatte, sowie einen 7-jährigen Patienten mit Monocytenleukämie.

Als Kontrolle dienten Blut- und Knochenmarkausstriche von 70 Kindern, bei denen keine malignen Erkrankungen vorlagen.

1. Material und Methoden

Peripher venöses Blut sowie Knochenmark wurden durch Punktion gewonnen und in EDTA-Röhrchen überführt.

Anschließend wurde das Blut bzw. das Knochenmark mit Barbitol-Na/HCl Puffer (0,1 m, pH 7) im Verhältnis 1:1 vermischt und 10 Minuten lang bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Abheben des Überstandes wurden 50 μ l der zellreichen Schicht gewonnen und erneut mit dem gleichen Volumen an Puffer versetzt. Danach wurde 1 μ l entsprechend 5 Internationalen Einheiten Heparin (Heparin-Na Braun, 1 ml = 5000 I.E.) zugegeben und die Probe für ca. 1 - 2 Minuten leicht geschüttelt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

Hierauf wurde ein Blut- bzw. Knochenmarkausstrich angefertigt und nach Lufttrocknen mit einer 0,4%igen 9-Aminoacridinhydrochlorid-Lösung (Merck) gefärbt. Nach einer Färbedauer von 20 Minuten wurde der Farbstoff mit 70%igem Ätha-

nol sorgfältig abgespült. Nach Trocknen wurde der Ausstrich erneut mit einer wäßrigen 5×10^{-4} molaren Pseudoisocyaninchlorid-Lösung (Riedel de Haen) oder einer wäßrigen Acridinorange-Lösung (1:30000) für 5 Minuten gefärbt.

Neuraminidase-Versuch

Bei 2 Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie wurden zusätzlich Untersuchungen mit Neuraminidase durchgeführt. EDTA-Knochenmark wurde in Plastikgefäße überführt und mehrmals bei 1000 Umdrehungen pro Minute mit Barbitol-Na/HCl Puffer gewaschen. Danach wurden 125 μ l zellreiche Flüssigkeit gewonnen und mit 125 μ l Puffer vermischt. Nach Zugabe von 10 μ l Neuraminidase (Serva 30244) wurde das Gemisch für 10 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 C inkubiert. Anschließend wurden 3 μ l (15 I.E.) Heparin zugesetzt.

Das Anfertigen und Färben der Ausstriche erfolgte wie oben beschrieben.

Als Kontrolle diente jeweils eine Probe ohne Neuraminidase-zusatz.

Mikroskopische Untersuchung

Die Auswertung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Ortholux II (Leitz) vorgenommen unter Verwendung des Blauerregersfilters BG 612 und des Sperrfilters TG 510. Photographische Bilder wurden mit der Kamera Ectachrome Highspeed (Tageslicht) bei einer Belichtungszeit von 8-10 Sekunden aufgenommen.

2. Ergebnisse

Befunde der Kontrollgruppe

Betrachtet man die Blutaussstriche der *gesunden* Kinder sowie der Patienten mit nicht malignen Erkrankungen unter dem Fluoreszenzmikroskop, so findet sich das dem Blut zugefügte Heparin als hell aufleuchtender Heparin-Farbstoffkomplex dicht an die Zellen des Blutes gebunden. Dies gilt sowohl für Erythrocyten als auch für Granulocyten, mononukleäre Zellen und Thrombocyten.

Bei Untersuchung des Knochenmarks zeigt sich ebenfalls eine enge Bindung des Heparin an alle Zellen der Blutbildung, unabhängig von ihrem Reifungsgrad. Sie findet sich bei Zellen der Erythropoese ebenso wie bei Zellen der granulopoetischen Reihe und den Vorstufen der Thrombocyten, den Megakaryocyten.

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt aus dem peripheren Blut eines gesunden Kindes: bei der hellen, rundlichen Zelle im Zentrum des Bildes handelt es sich um einen Lymphocyten; die Heparin-Farbstoffkomplexe sind unmittelbar an seine Zellmembran angelagert.



Abb. 1: Peripheres Blut eines gesunden Kindes

Befunde der Patienten mit malignen Erkrankungen

Bei allen untersuchten Patienten mit malignen Erkrankungen (Tab. 1) finden sich sowohl im Blut als auch im Knochenmark maligne Zellen, die ein verändertes Verhalten gegenüber den Heparin-Farbstoffkomplexen aufweisen. Es ist zwar noch eine klare Beziehung des Heparin zur Zelloberfläche vorhanden, aber die Anlagerung erfolgt in zahlenmäßig geringerem Ausmaß und in größerem Abstand zur Zellmembran. In manchen Fällen ist sie nur noch als schmaler fluoreszierender Saum in einiger Entfernung von der Zelloberfläche erkennbar. Die Affinität der Heparin-Farbstoffkomplexe zur Oberfläche maligner Zellen ist also deutlich herabgesetzt.

Abbildung 2 zeigt einen Ausschnitt aus dem peripheren Blut eines Kindes mit akuter lymphatischer Leukämie: während die Erythrocyten ebenso wie beim Gesunden eine dichte Bindung des Heparin an ihre Zellmembran aufweisen, liegt zwischen dem leukämischen Lymphoblasten und den Heparin-Farbstoffkomplexen eine deutliche Distanz.

Einen analogen Befund zeigt Abbildung 3 am Knochenmark eines Kindes mit Neuroblastom, bei dem die bösartige Geschwulst ins Knochenmark metastasiert war: die Erythrocyten lagern auch hier das Heparin dicht an ihre Zellmembran an, die Neuroblastomzelle hingegen stößt die Heparin-Farbstoffkomplexe ab.

Name, Geschlecht, Alter, Diagnose, Untersuchungsmaterial

C.Z.,	w.,	3 J.	ALL	Blut/Knochenmark
A.K.,	m.,	9 J.	ALL	Blut/Knochenmark
I.K.,	w.,	9 J.	ALL	Blut/Knochenmark
S.S.,	m.,	4 J.	ALL	Blut/Knochenmark
V.N.,	m.,	6 J.	ALL	Blut/Knochenmark
E.S.,	w.,	8 J.	ALL	Blut/Knochenmark
K.R.,	w.,	4 J.	ALL	Blut/Knochenmark
C.Z.,	m.,	11 J.	ALL	Blut/Knochenmark
A.B.,	m.,	8 J.	ALL	Blut/Knochenmark
E.E.,	m.,	10 J.	ALL	Blut/Knochenmark
F.S.,	w.,	60 J.	CLL	Blut
E.C.,	m.,	7 J.	Monocyten- leukämie	Blut/Knochenmark
O.K.,	m.,	10 J.	Neuroblastom	Knochenmark
S.W.,	m.,	8 J.	Neuroblastom	Knochenmark
B.S.,	w.,	1 J.	Neuroblastom	Knochenmark

Tab. 1: Patienten und Untersuchungsmaterial

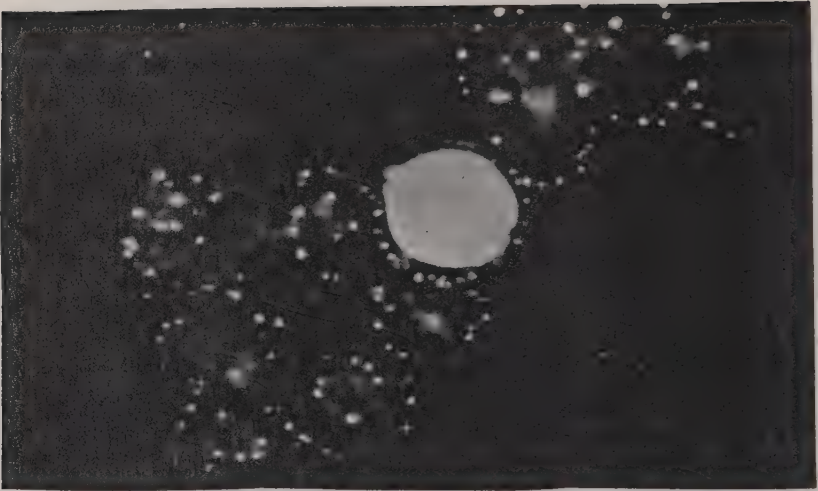


Abb. 2: Peripheres Blut eines Kindes mit ALL

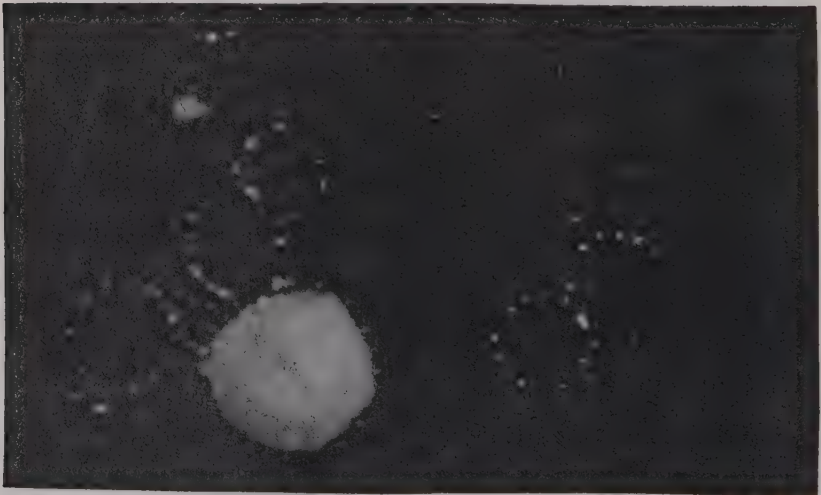


Abb. 3: Knochenmark eines Kindes mit Neuroblastom

Zu beachten ist, daß nicht alle malignen Zellen diese Heparin abstoßende Eigenschaft aufweisen. So zeigt ein geringerer Anteil der Zellen, die anhand ihrer Morphologie als eindeutig maligne zu klassifizieren sind, eine deutliche Heparinanlagerung.

Da sich andererseits im Blut und im Knochenmark Gesunder keine einzige Heparin abweisende Zelle nachweisen läßt, kann gefolgert werden, daß die Abstoßung der Heparin-Farbstoffkomplexe ein für maligne Zellen spezifisches Oberflächenmerkmal ist, jedoch nicht alle bösartigen Zellen dieses Merkmal besitzen.

Neuraminidase-Versuch

Bei den beiden Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie, deren Knochenmark mit Neuraminidase inkubiert wurde, ließ sich keine Zelle mit Heparin abweisender Eigenschaft mehr auffinden. Auch die leukämischen Lymphoblasten zeigten im Gegensatz zum Vorbefund ohne Neuraminidase-Inkubation eine enge Anlagerung des Heparin an ihre Zellmembran (Abb. 4 u. 5).

Durch Einwirken des Enzyms Neuraminidase auf eine maligne Zelle läßt sich also eine Angleichung ihres Oberflächenverhaltens an das einer gesunden Zelle erreichen.

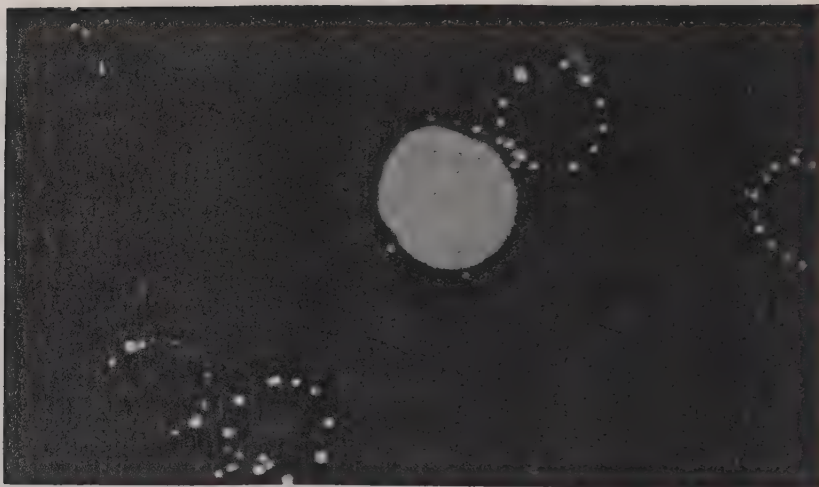


Abb. 4: Knochenmark eines Kindes mit ALL

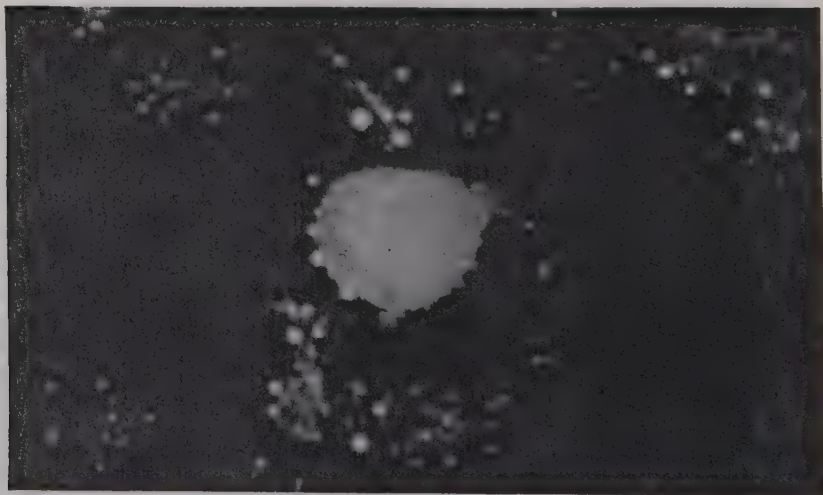


Abb. 5: ALL-Knochenmark nach Neuraminidaseinkubation

III. Diskussion

1. Struktur des Heparin

Um das unterschiedliche Anlagerungsverhalten des Heparin an gesunde und maligne Zellen erklären zu können, muß zunächst seine chemische Struktur betrachtet werden.

Heparin ist ein Polysaccharid, dessen Molekulargewicht 17000 - 20000 beträgt. Zusammengesetzt ist es aus Sulfo-nylamino-glucose und Schwefelsäureestern der Glucuronsäure, die in 1→4 glykosidischer Bindung miteinander verknüpft sind. Der Schwefelsäuregehalt ist mit 4 - 5 Molekülen pro Tetrasaccharideinheit relativ hoch, als zusätzliche saure Gruppen sind die Carboxylgruppen der Glucuronsäure vorhanden. Es fällt somit auf, daß Heparin eine ausgesprochen saure Substanz ist, die pro Glykosideinheit mindestens eine negative Valenz aufweist.

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt das Verhalten von Heparin gegenüber der Oberfläche verschiedener Zellen, so liegt der Gedanke nahe, daß die Anlagerung bzw. Abstossung von Heparin wohl in erster Linie auf elektrostatischen Kräften beruhen könnte, genauer gesagt, daß die Heparin abstoßende Zelle entweder mehr negativ oder weniger positiv geladene Gruppen in ihrer Zellmembran trägt als die Zelle, die Heparin anlagert.

2. Die Zellelektrophorese

Die wohl geeignetste Methode zur Erfassung der Oberflächenladung von Zellen ist die Zellelektrophorese.

2.1. Theoretische Grundlagen, Versuchsanordnung

Ihre physikalische Grundlage hat diese Untersuchungsmethode in der Tatsache, daß Zellen in einer Flüssigkeit sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes je nach ihrer Oberflächenladung in Richtung auf einen der beiden elektrischen Pole hin bewegen. Da in der Regel bei Säuregetierzellen die negative Ladung überwiegt, bewegen sich die Zellen zur positiv geladenen Anode, wobei die Geschwindigkeit, mit der die Zellen wandern, vom Ausmaß ihrer Oberflächenladung abhängt.

Als Maß für das elektrophoretische Verhalten einer Zelle wird meistens die sogenannte elektrophoretische Mobilität angegeben, deren physikalische Einheit $\mu\text{sec/V/cm}$ (Weg/Zeit/Feldstärke) ist. Da die Feldstärke während der Versuche konstant gehalten wird, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, gibt die elektrophoretische Mobilität ein direktes Bild über die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen und damit über ihr Oberflächenpotential.

Dabei ist allerdings zu beachten, daß eine zellelektrophoretische Untersuchung nur Auskunft über die Nettoladung einer Zelle geben kann, die sich aus der Summe positiver und negativer Ladungen ergibt. Sie kann weder aussagen, wieviele positive und negative Ladungsträger an der Zelloberfläche vorhanden sind, noch, welche chemischen Strukturen zum Aufbau des elektrokinetisch wirksamen Potentials beitragen.

Bei der herkömmlichen Zellelektrophorese wird die Wanderung der Zellen mikroskopisch erfaßt. Als Betrachtungsebene dient eine der beiden sogenannten stationären Ebenen der mit der Zellsuspension gefüllten Elektrophorese-

kammer; nur in diesen beiden Ebenen wandern die Zellen unbeeinflußt von Flüssigkeitsströmungen, die sich aus der unterschiedlichen Ladung der Kammerwand gegenüber der umgebenden Flüssigkeit ergeben. Die Wegstrecke, die die Zellen zurücklegen, ist mittels eines geeichten Okularmikrometers festgelegt; die Zeit, die die Zellen zum Zurücklegen dieser Strecke benötigen, wird vom Untersucher mit der Stoppuhr gemessen. Da nach einer gewissen Zeit durch Zellsedimentation bedingte Störströmungen auftreten, ist die Meßdauer meist auf ca. 30 Minuten begrenzt. Damit ist auch die untersuchte Zellzahl eingeschränkt, so daß nicht immer ein repräsentativer Querschnitt des gesamten Untersuchungsmaterials zu erwarten ist.

Einen wesentlichen Fortschritt brachte vor einigen Jahren die Entwicklung einer neuen Technik für zellelektrophoretische Untersuchungen, des "electrophoretic light scattering". Bei dieser Methode wird die Reflexion von Laserlicht durch wandernde Zellen genutzt, um ihre elektrophoretische Beweglichkeit festzustellen. Vorteile gegenüber der herkömmlichen Zellelektrophorese liegen in der sehr kurzen Meßdauer (1 - 5 Sekunden) und vor allem in der gleichzeitigen Registrierung aller Zellen.

Im folgenden soll untersucht werden, ob sich in der Literatur über zellelektrophoretische Untersuchungen eindeutige Hinweise für eine veränderte Oberflächenladung maligne entarteter Zellen finden, die somit auch das veränderte Verhalten der malignen Zelle gegenüber den Heparin-Farbstoffkomplexen erklären könnten.

2.2. Elektrophoretische Beweglichkeit maligner Zellen und gesunder Vergleichszellen

Bereits 1956 konnten Ambrose, James und Lowick bei Hamstertumorzellen, die sie durch Stilböstrol induziert hatten, sowie bei Rattenleberzellen, die sie durch Buttergelb maligne transformiert hatten, ein höheres Membranpotential nachweisen, als es die gesunden Ausgangszellen besaßen (1). Zwei Jahre später fanden Purdom, Ambrose und Klein eine Zunahme negativer Membranladung bei Übergang eines Mäusesarkoms von der lokalisierten in die bösartige Ascitesform (31). 1964 veröffentlichte Rueff weitere Ergebnisse, die auf ein höheres negatives Überschußpotential maligner Zellen hindeuten (33). Er untersuchte Tumorzellen aus primären Malignomen des Magendarmtraktes (Magen-, Kolon-, Rektumkarzinom) und wählte als Vergleichszellen gesunde Schleimhautzellen aus der weiteren Tumorumgebung. In allen untersuchten Fällen fand sich bei den Tumorzellen eine gegenüber den Vergleichszellen erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit.

2.3. Elektrophoretische Beweglichkeit gesunder Blutzellen

2.3.1. Erythrocytenbeweglichkeit

Bereits 1941 konnten Furchgott und Ponder die elektrophoretische Mobilität menschlicher Erythrocyten mit einem Wert von $1,3 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ angeben (12). Ruhenstroth-Bauer fand bei der Untersuchung von Blutproben 28 gesunder Personen eine Erythrocytenbeweglichkeit von $1,27 \pm 0,017 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ (34). Vergleichbare Werte erhielt auch Rueff an 40 Blutproben Gesunder (33). Ihm fiel ferner auf, daß die Erythrocytenbeweglichkeit nicht nur beim Gesunden eine konstante Größe mit geringer Streubreite ist, son-

dern auch bei vielen Kranken keine Abweichung von der Norm zeigt.

2.3.2. Leukocytenbeweglichkeit

Im Hämozytopherogramm, einer bildlichen Darstellung der elektrophoretischen Beweglichkeit verschiedener Blutzellen, bei der auf der Abszisse eine Skala der elektrophoretischen Mobilität wiedergegeben ist, während man aus der Ordinate auf die Zahl der untersuchten Zellen schließen kann, fand Rueff beim Gesunden einen Granulocytenblock mit einer durchschnittlichen elektrophoretischen Beweglichkeit von $0,845 \pm 0,045 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, der Durchschnittswert für Lymphocyten lag bei $1,026 \pm 0,047 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ (33). Weitere Werte für die elektrophoretische Mobilität gesunder Blutzellen geben Lichtman und Weed an (26). Sie untersuchten Erythrocyten sowie Granulocyten und Lymphocyten gesunder Personen nach Zellseparation und Resuspension in autologem Serum. Dabei fanden sie eine Erythrocytenbeweglichkeit von $2,13 \pm 0,017$, eine Granulocytenbeweglichkeit von $1,38 \pm 0,041$ und eine Lymphocytenbeweglichkeit von $1,81 \pm 0,046 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$. Diese Werte liegen erheblich über den vorher genannten. Nimmt man jedoch veränderte Versuchsbedingungen an und rechnet die Erythrocytenbeweglichkeit auf den von Rueff und Ruhenstroth-Bauer gefundenen Normwert von $1,27 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ um (es ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von ca. 0,6), so ergibt sich bei Anwendung des Umrechnungsfaktors auf die weißen Blutzellen eine Granulocytenbeweglichkeit von ca. 0,83 und eine Lymphocytenbeweglichkeit von ca. 1,08 $\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$. Diese Werte sind mit denen von Rueff und Ruhenstroth-Bauer praktisch identisch.

Neuere Untersuchungen an Lymphocytensuspensionen ergaben, daß mit Hilfe der Zellelektrophorese eine weitere Differenzierung der Lymphocyten in zwei Subpopulationen mit verschiedener elektrophoretischer Mobilität möglich ist. Nordling, Andersson und Hävry fanden im Tierversuch eine zweigipfelige Verteilung von Lymphocyten aus Mäuselymphknoten und stellten anhand serologischer Untersuchungen sowie der unterschiedlichen Auslösbarkeit einer graft-versus-host Reaktion fest, daß sich die langsamer wandernde Population hauptsächlich aus B-Lymphocyten und die schneller wandernde Population hauptsächlich aus T-Lymphocyten zusammensetzte (28).

Untersuchungen an menschlichen Lymphocyten zeigten vergleichbare Ergebnisse. So fanden Sabolovic, Sabolovic und Amiel im Blut Gesunder eine Lymphocytenpopulation mit einer mittleren elektrophoretischen Mobilität von $0,81 \mu/\text{sec/V/cm}$, die anteilmäßig ca. 25% der gesamten Lymphocyten ausmachte, und eine weitere Lymphocytenpopulation mit einer mittleren elektrophoretischen Beweglichkeit von $1,13 \mu/\text{sec/V/cm}$, deren Anteil an allen Lymphocyten ca. 75% betrug (37).

Ebenfalls eine zweigipfelige Verteilung der Lymphocytenbeweglichkeit wiesen Smith, Ware und Yankee an Lymphocytensuspensionen Gesunder nach (41). In weiteren Versuchen bedienten sie sich der Rosettenbildung von T-Lymphocyten mit spezifisch vorbehandelten Schafserythrocyten bzw. der Rosettenbildung von B-Lymphocyten mit einem synthetisch hergestellten Complement und anschließender Zentrifugation, um T-Zellen bzw. B-Zellen weitgehend aus den Lymphocytensuspensionen zu entfernen. Bei anschließender elektrophoretischer Untersuchung entsprach die Wanderung der T-Zellarme Fraktion vorwiegend dem langsameren Mobilitätsgipfel der gesamten Lymphocytensuspension, während die B-Zell-

arme Fraktion in ihrer Beweglichkeit dem schnelleren Mobilitätsgipfel der gesamten Lymphocytensuspension glich. Damit hatten sie den Nachweis erbracht, daß es sich bei den langsamer wandernden Zellen hauptsächlich um B-Zellen handelt, während sich die schneller wandernde Fraktion vor allem aus T-Zellen zusammensetzt.

2.3.3. Beweglichkeit von Sternalmarkzellen

Bei zellelektrophoretischer Untersuchung von Sternalpunktaten 10 gesunder Personen fand Rueff in übereinstimmender Weise eine durchschnittliche elektrophoretische Mobilität der Sternalmarkzellen von $1,184 \pm 0,061 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ (33). Dieser Wert lag wesentlich höher als der an reifen Granulocyten im peripheren Blut gewonnene Wert von $0,0845 \pm 0,061 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$. Daraus ließ sich schließen, daß alle Vorstufen der myeloischen Reihe, offenbar auch die stabkernigen und segmentkernigen Granulocyten, die vor ihrer Ausschwemmung ins Blut im Knochenmark liegen, eine höhere negative Überschußladung ihrer Zelloberfläche besitzen als die ausgereiften Blutzellen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Lichtman und Weed bei der Gegenüberstellung der elektrophoretischen Beweglichkeit reifer Granulocyten und der unreifer Vorstufen aus dem Knochenmark Gesunder (26).

2.4. Elektrophoretische Beweglichkeit von Leukämiezellen

2.4.1. Chronisch myeloische Leukämie

Bei zellelektrophoretischer Untersuchung des Blutes von 13 Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie fand Rueff, daß der im normalen Hämozytopherogramm vorhandene

Granulocytenblock in allen Fällen durch eine Fraktion schneller wandernder Zellen mit einer durchschnittlichen elektrophoretischen Mobilität von $1,205 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ ersetzt war (33). Bei sieben Patienten fanden sich wenige Lymphocyten mit normaler elektrophoretischer Beweglichkeit im Blut, die jedoch wegen des starken Überwiegens der myeloischen Zellen nur schwer aufzufinden waren. Auffallend an den Ergebnissen war, daß die myeloischen Zellelemente in ihrem Beweglichkeitsgipfel ($1,205 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$) den Sternalmarkzellen Gesunder glichen ($1,225 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$); lediglich die Streubreite der Sternalmarkzellen war größer als die der schnellen myeloischen Zellen aus dem peripheren Blut der Leukämiekranken.

Auch Lichtman und Weed untersuchten myeloische Zellelemente aus dem Knochenmark Gesunder sowie dem Blut von CML-Patienten und fanden gleiche Werte für ihre elektrophoretische Beweglichkeit (26). Sie verglichen ferner Sternalmarkzellen Gesunder mit Sternalmarkzellen der Leukämiepatienten und konnten auch hier keinen Unterschied feststellen.

Angesichts dieser Befunde wäre es denkbar, die höhere elektrophoretische Mobilität der Leukämiezellen bei chronisch myeloischer Leukämie gegenüber der niedrigeren Beweglichkeit gesunder, reifer Granulocyten in erster Linie als Ausdruck ihrer Unreife zu deuten.

2.4.2. Chronisch lymphatische Leukämie

Bei zellelektrophoretischer Untersuchung des Blutes von 7 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie fand Rueff ein Fehlen des normalen Lymphocytenblocks; dieser war analog zu dem Befund bei chronisch myeloischer Leuk-

ämie durch eine Fraktion schneller wandernder Zellen mit einer durchschnittlichen elektrophoretischen Mobilität von $1,221 \pm 0,039 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ ersetzt (33). In drei Fällen ließen sich einige wenige Leukocyten mit der elektrophoretischen Beweglichkeit normaler Granulocyten auffinden, was aufgrund der Überzahl lymphatischer Zellen sehr schwierig war.

Um zu prüfen, ob auch die Vorstufen der lymphatischen Zellen ein höheres negatives Membranpotential aufweisen, wie es bei den Zellen der Granulopoese der Fall war, untersuchte Rueff lymphatische Zellen aus den Leistenlymphknoten jugendlicher Patienten auf ihre elektrophoretische Mobilität. Hierbei konnte er regelmäßig zwei Beweglichkeitsgipfel nachweisen, wobei die langsamere Fraktion in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit den reifen Blutlymphocyten glich, während die schnellere Fraktion in etwa die gleiche elektrophoretische Mobilität aufwies wie die lymphatischen Zellen bei chronisch lymphatischer Leukämie. Rueff folgerete daraus, daß unreife lymphatische Zellen im Lymphknoten ebenso wie unreife Zellen der granulopoetischen Reihe im Knochenmark ein höheres negatives Membranpotential aufweisen als die entsprechenden reifen Zellen im Blut. Das Vorhandensein lymphatischer Zellen mit niedriger elektrophoretischer Mobilität im Lymphknoten führte er auf eine Rezirkulation reifer Lymphocyten aus dem peripheren Blut in das Lymphsystem zurück.

Ob diese Theorie heute noch haltbar ist, muß in Frage gestellt werden. Wendet man neuere Erkenntnisse auf Rueffs Befund an, so könnte man eher vermuten, daß es sich bei der schneller wandernden Fraktion um T-Lymphocyten und bei der langsamer wandernden Fraktion um B-Lymphocyten handelte. Allerdings ist es dann nicht erklärlich, daß Rueff und nach ihm Lichtman und Weed im peripheren Blut nur eine Lymphocytenpopulation mit einer geringen Streubreite ihrer elek-

trophoretischen Mobilität fanden.

In Übereinstimmung mit Rueffs Befund, daß Lymphocyten von CLL-Patienten eine höhere elektrophoretische Mobilität aufweisen als Lymphocyten Gesunder, stehen vorangehende Untersuchungen Ruhenstroth-Bauers, der bei 15 Lymphadenosekranken ebenfalls eine erhöhte negative Oberflächenladung der lymphocytären Elemente fand (34). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Leukämiezellen übertraf zum Teil sogar die der Erythrocyten, die im normalen Hämozytopherogramm die schnellste Zellfraktion darstellen.

Im Gegensatz zu Ruhenstroth-Bauer und Rueff konnten Lichtman und Weed beim Vergleich von Lymphocyten aus dem Blut Gesunder mit Lymphocyten von 10 Patienten mit der Diagnose CLL keinen Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität feststellen (26).

In einer neueren, umfangreichen Studie untersuchten Sabolovic, Sabolovic und Amiel Lymphocyten von 71 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und wählten als Kontrolle Lymphocyten von 81 im Alter angeglichenen gesunden Personen (37). Im Gegensatz zu den vorher genannten Autoren war ihnen die Auftrennbarkeit normaler Lymphocyten in zwei verschieden schnell wandernde Populationen, zum Teil aus eigenen Untersuchungen an Mäuselymphocyten und an menschlichen Lymphocyten, bekannt. Auch in dieser Studie fanden sie eine Fraktion mit einer durchschnittlichen elektrophoretischen Mobilität von $0,81 \mu/\text{sec/V/cm}$ und eine schnellere Fraktion mit einer durchschnittlichen elektrophoretischen Mobilität von $1,13 \mu/\text{sec/V/cm}$. Die CLL-Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Therapie erhielten, besaßen dagegen nur eine Lymphocytenpopulation, deren mittlere elektrophoretische Beweglichkeit jedoch nicht in allen Fällen die gleiche war; die Lymphocyten von

17% der Patienten hatten eine durchschnittliche elektro-phoretische Mobilität von $0,78 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, bei 68% der Patienten betrug dieser Wert $1,03 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, bei den restlichen 15% der Patienten $1,13 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$.

Betrachtet man diese Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt, daß die chronisch lymphatische Leukämie in der weitaus größten Zahl der Fälle eine B-Zell-Leukämie ist und der B-Lymphocyt somit als gesunde Ausgangszelle dieser Erkrankung angesehen werden kann, so findet man bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten eine gegenüber dem normalen B-Lymphocyt erhöhten negative Oberflächenladung der leukämischen Zellen.

Insgesamt muß jedoch festgehalten werden, daß die Befunde der verschiedenen Autoren keineswegs in Einklang zu bringen sind und eine Beurteilung auch deswegen schwierig erscheint, da schon die an gesunden Lymphocyt gewonnenen Ergebnisse nicht übereinstimmen.

2.4.3. Akute myeloische Leukämie

Über das elektrophoretische Verhalten leukämischer Myeloblasten gibt es nur wenige Hinweise.

Ruhenstroth-Bauer fand an Hämozytopherogrammen von 6 Patienten mit akuter Myelose ein Fehlen von Zellen mit der elektrophoretischen Mobilität normaler Granulocyt (34). Die pathologischen Zellen, deren Wanderungsgeschwindigkeit knapp ober- oder unterhalb der Erythrocytenbeweglichkeit lag, bildeten meist keine einheitliche Population, sondern zerfielen in zwei oder mehrere Gruppen mit unterschiedlichem Oberflächenpotential.

Lichtman und Weed untersuchten die leukämischen Zellen von 8 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und verglichen sie mit Zellen der Granulopoese aus dem Knochenmark Gesunder (26). Obwohl sie keinen statistisch signifikanten Unterschied fanden - die mittlere elektrophoretische Mobilität der leukämischen Blasten betrug $2,01 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, der Wert für die unreifen Granulocyten lag bei $1,84 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ - fiel ihnen auf, daß in drei Fällen die Wanderungsgeschwindigkeit der leukämischen Myeloblasten deutlich erhöht war.

2.4.4. Akute lymphatische Leukämie

Einen ersten Versuch, durch zellelektrophoretische Messungen Einblick in das Oberflächenverhalten leukämischer Lymphoblasten gegenüber dem normaler Lymphocyten zu gewinnen, unternahmen Cook und Jakobson (7). Sie untersuchten Lymphocyten aus Lymphknoten gesunder Mäuse sowie Lymphoblasten aus leukämisch infiltrierten Lymphknoten von Mäusen, denen ein ALL-Zellstamm subperitoneal implantiert worden war. Hierbei fanden sie, daß die elektrophoretische Beweglichkeit der Leukämiezellen mit einem Mittelwert von $1,04 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ erheblich unter der Beweglichkeit der normalen Lymphocyten lag, deren Mittelwert $1,27 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ betrug.

Auch hier erscheint eine Interpretation des Befundes schwierig, da allein schon die Tatsache, daß Cook und Jakobson in den normalen Lymphknoten nur eine Lymphocytenpopulation nachweisen konnten, in Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren steht.

So fand schon Rueff in Lymphknoten Jugendlicher zwei Lymphocytenfraktionen mit unterschiedlicher elektropho-

retischer Mobilität, wenn er auch diesen Befund noch nicht exakt deuten konnte (33).

Ebenfalls zwei Lymphocytenpopulationen fanden Sabolovic, Sabolovic und Dumont bei der Untersuchung des Blutes gesunder Mäuse, während sie im Blut von Mäusen mit congenitaler Thymusaplasie nur die langsam wandernde Lymphocytenfraktion nachweisen konnten (35).

Diese Befunde stehen in Einklang mit den schon oben erwähnten von Nordling, Andersson und Härvy, die an Mäuselymphknoten anhand serologischer Untersuchungen die schnelle Fraktion als T-Zell-Fraktion und die langsame als B-Zell-Fraktion identifizieren konnten (28).

Sabolovic, Sabolovic und Dumont untersuchten Lymphocyten-suspensionen 44 gesunder Personen und fanden ebenfalls eine zweigipfelige Verteilung der elektrophoretischen Beweglichkeit, wobei die Werte mit denen von Mäuselymphocyten nahezu übereinstimmten (Mittelwerte der beiden Mäuselymphocytenpopulationen: 0,76 und 1,23 μ /sec/V/cm, Mittelwerte der menschlichen Lymphocyten: 0,80 und 1,20 μ /sec/V/cm) (35). Daraus läßt sich ableiten, daß bezüglich der Lymphocytenbeweglichkeit die Anwendung eines Tiermodells auf Verhältnisse beim Menschen zulässig erscheint; dennoch ist der Aussagewert von Cooks und Jakobs Ergebnissen aus dem oben angeführten Grund eingeschränkt.

Neuere Untersuchungen zur elektrophoretischen Mobilität leukämischer Lymphoblasten stammen von Sabolovic, Sabolovic und Amiel (37). Sie fanden im Blut von 12 Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie nur jeweils eine Lymphoblastenpopulation, wobei 12% der Fälle Lymphoblasten mit einer mittleren elektrophoretischen Beweglichkeit von

0,83 μ /sec/V/cm aufwiesen, während in 75% der Fälle die mittlere Lymphoblastenbeweglichkeit 1,05 μ /sec/V/cm und in weiteren 12% der Fälle 1,12 μ /sec/V/cm betrug. Vergleicht man diese Werte mit denen normaler Lymphocyten im peripheren Blut (mittlere elektrophoretische Beweglichkeit der B-Zellen: 0,81 μ /sec/V/cm, mittlere elektrophoretische Beweglichkeit der T-Zellen: 1,13 μ /sec/V/cm), so zeigt sich, daß bei 12% der Patienten die Wanderungsgeschwindigkeit der normaler T-Lymphocyten gleich, und sich bei 75% der Patienten die elektrophoretische Mobilität der Lymphoblasten noch im Randbereich der Beweglichkeitsverteilung normaler T-Lymphocyten befand (normale T-Lymphocyten zeigten eine Streuung von 1,00 bis 1,18 μ /sec/V/cm).

Parallel zum elektrophoretischen Verhalten der leukämischen Lymphoblasten bestimmten Sabolovic, Sabolovic und Amiel auch deren Oberflächenmarker, konnten jedoch keinerlei Beziehungen zu der elektrophoretischen Beweglichkeit der Zellen herstellen.

Weitere zellelektrophoretische Messungen an leukämischen Lymphoblasten liegen von Smith, Ware und Weiner vor, die sich bereits der neuen Technik des "electrophoretic light scattering" bedienten (40). An Lymphocytensuspensionen Gesunder fanden sie meist die typische zweigipfelige Beweglichkeitskurve; in anderen Fällen war die kleinere, langsam wandernde B-Zell-Population nur als Ausbuchtung vor dem eigentlichen Hauptgipfel erkennbar. Die elektrophoretische Mobilität der leukämischen Lymphoblasten, untersucht an 9 Patienten mit ALL, zeigte im Gegensatz hierzu eine ausgesprochen schmale, symmetrische Verteilung und lag deutlich unter der durchschnittlichen Beweglichkeit der normalen Lymphocyten. Der Unterschied betrug Größenmäßig 7 - 28%. Da die Autoren den Mittelwert für die normale Lymphocytenbeweglichkeit aus der

Wanderungsgeschwindigkeit aller Lymphocyten bildeten und somit nicht zwischen B-Zellen und T-Zellen differenzieren, ist an ihren Untersuchungsergebnissen kein direkter Vergleich der Lymphoblasten mit einer der beiden normalen Lymphocytenpopulationen möglich.

Smith, Ware und Yankee fanden beim Vergleich leukämischer Lymphoblasten, die an ihrer Zelloberfläche weder T- noch B-Zellmarker trugen, mit Lymphocyten aus dem Blut Gesunder, deren schnelle bzw. langsame Zellfraktion sie mit Hilfe der oben beschriebenen Rosettenbildung als T- bzw. B-Lymphocyten identifiziert hatten, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der leukämischen Blasten bei einer Ionenstärke von 0,015 m der langsameren B-Zellfraktion entsprach (41). Führt man die zellelektrophoretischen Untersuchungen dagegen bei der physiologischen Ionenkonzentration von 0,15 m durch, so glichen die leukämischen Blasten in ihrer Beweglichkeit der normalen T-Zellfraktion. Die Wanderungsgeschwindigkeit der T- und B-Zellen blieb in ihrer Relation von der veränderten Ionenstärke unbeeinflusst. Aus dem sowohl von normalen B-Zellen als auch von normalen T-Zellen abweichenden Verhalten der Leukämiezellen folgerten die Autoren, daß leukämische Lymphoblasten eine von gesunden Lymphocyten grundsätzlich verschiedene Oberflächenstruktur besitzen.

Einen interessanten Beitrag zum Oberflächenverhalten leukämischer Lymphoblasten lieferten Sabolovic, Pompidou und Amiel mit einer Verlaufsstudie, die sie an drei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie vornahmen (36). Anhand elektrophoretischer Untersuchung ihrer lymphatischen Zellen konnten sie zeigen, daß bei zwei Patienten kurz vor dem Auftreten eines Rückfalls die Beweglichkeit der schnellen Zellfraktion ausgehend von einem Normalwert von ca. 1,14 μ /sec/V/cm abnahm. Bei voller klinischer Ausprägung

des Rückfalls fanden sich vorwiegend Zellen mit einer elektrophoretischen Mobilität von ca. $1,04 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$, die offenbar den leukämischen Blasten entsprachen, während die Zellelemente mit normaler B- und T-Zellbeweglichkeit stark zurückgedrängt waren. Kam es unter Chemo- und Immunotherapie zu einer Remission, so glich die elektrophoretische Mobilität der schnellen Zellfraktion wieder der normaler T-Lymphocyten. Bei dem dritten Patienten, der unter Immunotherapie in Remission blieb, blieb auch die elektrophoretische Beweglichkeit der T-Zellen normal.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bezüglich der elektrophoretischen Mobilität von Lymphoblasten bei ALL keine einheitlichen Ergebnisse vorliegen, jedoch mehr Hinweise für ein gegenüber normalen Blutlymphocyten herabgesetztes Oberflächenpotential der leukämischen Blasten sprechen.

Weiterhin wird die Beurteilung der Befunde dadurch erschwert, daß die Lymphoblasten bei ALL nicht bei allen Patienten einheitlichen Ursprungs sind. So kann die akute lymphatische Leukämie anhand zytochemischer Untersuchungen sowie der Bestimmung von Oberflächenmarkern weiter unterteilt werden, wobei ca. 30% durch Nachweis einer focalen sauren Phosphatase sowie der Rosettenbildung mit Schafserythrocyten als T-ALL einzuordnen sind, ca. 1 - 2% durch Immunglobulinnachweis an der Zelloberfläche als B-ALL identifiziert werden können, während der weitaus größte Anteil der ALL keine Oberflächenmarker aufweist. Diese Form der ALL wird als O-ALL bezeichnet; es wird vermutet, daß ihre Lymphoblasten von den Knochenmarkstammzellen der lymphocytären Reihe abstammen, die noch keine Differenzierung in Richtung auf die B- oder T-Zelllinie hin zeigen. Eine genauere Zuordnung dieser Leukämieform wird wohl in Zukunft durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Diagnostik möglich sein.

Man könnte nun vermuten, daß die drei verschiedenen ALL-Typen eine jeweils charakteristische elektrophoretische Mobilität ihrer Lymphoblasten aufweisen; doch konnten, wie schon oben erwähnt, Sabolovic, Sabolovic und Amiel, die an zwölf Patienten mit ALL drei verschieden schnell wandernde Lymphoblastenpopulationen fanden, keine Korrelation zwischen der elektrophoretischen Beweglichkeit und dem Fehlen oder Vorhandensein von Oberflächenmarkern herstellen.

2.5. Vergleich mit eigenen Ergebnissen

Versucht man nun, den Befund der Heparinabstoßung durch maligne Zellen im Gegensatz zu seiner Anlagerung an gesunde Zellen zu Ergebnissen zellelektrophoretischer Messungen in Beziehung zu setzen, so zeigt sich bald, daß die Heparin abweisende Eigenschaft der maligne entarteten Zelle nicht allein durch ein erhöhtes Oberflächenpotential zu erklären ist.

Zwar findet sich bei malignen Zellen solider Tumoren eine gegenüber dem gesunden Ausgangsgewebe erhöhte elektrophoretische Mobilität, bei bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems liegen jedoch keine einheitlichen Befunde vor. Bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie, die den Hauptanteil des eigenen Patientenkollektivs ausmachen, scheint die elektrophoretische Beweglichkeit der leukämischen Lymphoblasten eher unter der gesunder lymphocytärer Zellen zu liegen.

Es zeigt sich also, daß die Heparin abweisende Eigenschaft einer malignen Zelle nicht immer mit einer erhöhten Membranladung gegenüber einer gesunden Vergleichszelle einhergeht.

Ein weiteres Argument, das für eine Anlagerung bzw. Abstoßung des Heparin unabhängig vom Membranpotential der Zelle spricht, ergibt sich aus der Tatsache, daß alle gesunden Blutzellen Heparin an ihre Oberfläche binden, obwohl sie im elektrischen Feld ganz unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen. Der Erythrocyt, der von allen Blutzellen das höchste negative Überschußpotential besitzt, lagert Heparin ebenso an wie die langsamer wandernden lymphocytären und granulocytären Blutelemente. Auch an gesunde Knochenmarkszellen bindet sich Heparin, obwohl zumindest für die granulopoetische Reihe nachgewiesen ist, daß die unreife Knochenmarkszelle negativer geladen ist als die reife Blutzelle.

Es kann gefolgert werden, daß die Abstoßung von Heparin ein für die maligne Zelle spezifisches Oberflächenmerkmal ist, das sich nicht eindeutig auf eine erhöhte Membranladung der malignen Zelle zurückführen läßt.

3. Die Neuraminsäure

Wie schon oben erwähnt, kann die Zellelektrophorese nur Auskunft über die Summe der an der Zelloberfläche lokalisierten positiven und negativen Ladungen geben, nicht jedoch über die chemischen Strukturen, die am Aufbau des elektrokinetisch wirksamen Potentials beteiligt sind.

Als einer der wichtigsten Ladungsträger der Zelloberfläche wurde schon bald die N-Acetylneuraminsäure erkannt, die häufig Bestandteil membranbildender Glykoproteine und Glykolipide ist (25, 38).

5.1. Chemische Struktur, Einbau, Abbau

In ihrer chemischen Zusammensetzung entspricht die Neuraminsäure einem Kondensationsprodukt aus Mannosamin und Brenztraubensäure und ist als Ketosäure mit einem pK von 2,2 eine ungewöhnlich saure Substanz, deren Carboxylgruppe bei physiologischem pH größtenteils in dissoziierter Form vorliegt. Da sie in der Zellmembran meist endständig an den Oligosaccharidketten der Glykoproteine und Glykolipide lokalisiert ist, kann man annehmen, daß sie das Oberflächenverhalten einer Zelle entscheidend mitbeeinflusst.

Für die Übertragung der Neuraminsäure auf Glykoproteine bzw. Glykolipide sind zwei Schritte erforderlich. Zuerst wird die N-Acetylneuraminsäure mit Hilfe von Cytidintriphosphat unter Abspaltung von Pyrophosphat zu CMP-N-Acetylneuraminsäure aktiviert; daraufhin erfolgt der eigentliche Einbau in die Oligosaccharidkette durch spezifische Sialyltransferasen, die die aktivierte Neuraminsäure jeweils mit einem bestimmten Kohlenhydratrest verknüpfen (38).

Der umgekehrte Vorgang, die Befreiung der Neuraminsäure aus ihrer glykosidischen Bindung, geht unter Einwirken des Enzyms Neuraminidase vor sich. Dieses Enzym wurde erstmals in Influenzaviren und später auch in Cholera-vibrionen als sogenanntes Receptor-Destroying-Enzyme (RDE) gefunden, das nach einer zunächst eintretenden Erythrocytenagglutination eine nochmalige Zusammenballung der roten Blutkörperchen verhinderte. Nachdem der Receptor an der Erythrocytenoberfläche als N-Acetylneuraminsäure identifiziert worden war, stand fest, daß es sich bei dem RDE um ein Neuraminsäure abspaltendes Enzym, eine Neuraminidase, handelte. Im menschlichen Organismus wurde das Vorkommen von Neuraminidase in den Lysosomen der Zellen beschrieben. Interessant erscheint die Tatsache, daß oft

durch die Abspaltung der endständigen Neuraminsäure der Abbau des betreffenden Glykoproteins bzw. Glykolipids eingeleitet wird (38).

Im folgenden soll untersucht werden, ob sich in der Literatur Hinweise für einen veränderten Neuraminsäuregehalt maligner Zellen finden, die auch das veränderte Oberflächenverhalten der malignen Zelle gegenüber den Heparin-Farbstoffkomplexen erklären könnten. Hierbei wären dann wiederum elektrostatische Kräfte zu diskutieren, da sowohl die Neuraminsäure als auch Heparin bei physiologischem pH negative Ladungen tragen, die einander abstoßen.

3.2. Neuraminsäuregehalt gesunder und maligner Zellen

Ausgehend von der Beobachtung, daß viele maligne Zellen eine gegenüber ihren gesunden Ausgangszellen erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit aufwiesen und sich dieser Unterschied durch vorherige Neuraminidasebehandlung wieder aufheben ließ, beschäftigten sich viele Untersuchungen mit der Frage nach einem veränderten Neuraminsäuregehalt bösartiger Zellen (11). Zunächst wurden Bestimmungen an in vitro kultivierten Zellen vor und nach Transformation durch onkogene Viren durchgeführt. Die gemessene Neuraminsäuremenge wurde entweder auf eine festgelegte Zellzahl oder auf ein mg Membranprotein bezogen.

Diese Versuche führten zu stark divergierenden Ergebnissen. Hartmann, Buck et al. untersuchten verschiedene Zelllinien vor und nach Virustransformation auf ihren Neuraminsäuregehalt (15).

An gesunden BHK₂₁/C₁₃-Zellen (BHK = baby hamster kidney)

finden sie einen Ausgangswert von 6,7 nmol/mg Protein. Nach Transformation durch zwei Stämme des Rous Sarkom Virus, eines RNA-haltigen Virus, das vorwiegend zu Tumoren mesodermal angelegter Gewebe führt, lagen die Werte bei 6,8 bzw. 6,9 nmol/mg Protein; die maligne Umwandlung der Zellen hatte also keine Änderung im Neuraminsäuregehalt hervorgerufen. Wurden jedoch mit Hilfe des gleichen Virus embryonale Hühnerfibroblasten transformiert, so erfolgte ein Anstieg des Neuraminsäurewertes von 24,4 auf 32,6 nmol/mg Protein, was einer Zunahme um 34% entsprach.

Eine nur geringfügige Änderung zeigte sich bei embryonalen Hamsterzellen nach Transformation durch Polyoma-Virus, ein der Gruppe der Papovaviren zugehöriges Virus; hier war der Neuraminsäuregehalt mit 21,0 nmol/mg Protein gegenüber dem Vorwert von 19,9 nmol/mg Protein um 5% erhöht. Wurden die gleichen embryonalen Hamsterzellen dagegen mit SV 40-Virus, ebenfalls einem Papovavirus, zu malignen Zellen umgewandelt, so erfuhren sie einen Abfall ihres Neuraminsäurewertes von 19,9 auf 12,1 nmol/mg Protein, was einer Abnahme um 39% entsprach.

Auch andere Untersuchungen an Zellkulturen ließen keine einheitliche Änderung des Neuraminsäuregehalts durch Virus-transformation erkennen (9, 14, 23, 29, 30, 44). Schließlich folgerte man, daß in vitro Bedingungen Veränderungen der Zellform und -adhäsivität hervorrufen, die per se schon den Neuraminsäuregehalt der Zellen beeinflussen könnten und damit den Aussagewert der Ergebnisse stark einschränken.

Im Gegensatz zu den Versuchen an in vitro kultivierten Zellen ergaben Studien an in vivo entstandenen malignen Tumoren sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen

durchwegs eine Erhöhung der zellgebundenen Neuraminsäure gegenüber dem gesunden Ausgangsgewebe.

Keenan und Morré induzierten an Ratten Mammacarcinome durch eine einmalige orale Gabe von Dimethylbenzanthracen; anschließend untersuchten sie das Carcinomgewebe sowie das Mammagewebe gesunder Kontrolltiere auf den Neuraminsäuregehalt ihrer Zellen (21). Hierbei fanden sie, daß bei den carcinomatösen Zellen der Neuraminsäurewert mit 48,6 nmol/mg Protein um mehr als das Doppelte höher lag als der an gesunden Zellen gemessene Wert von 19,6 nmol/mg Protein.

Beim Vergleich von Hepatomzellen der Ratte mit gesunden Rattenleberzellen konnten Emmelot und Ros und später auch Kloppel und Morré ebenfalls einen erhöhten Neuraminsäuregehalt der Tumorzellen nachweisen (10, 24).

Eine Vermehrung der Neuraminsäure in menschlichem Karzinomgewebe fanden Mabry und Carubelli sowie Bryant, Stoner und Metzger (27, 4). Mabry und Carubelli untersuchten autoptisch entnommenes Gewebe eines Patienten mit Pankreasadenocarcinom, ferner eines Patienten mit einem Plattenepithelcarcinom der Haut, und verglichen es mit ebenfalls autoptisch gewonnenem Pankreas- bzw. Hautgewebe von Patienten, die an anderen Erkrankungen verstorben waren (27). Neben dem maligne entarteten Pankreas- und Hautgewebe untersuchten sie auch eine Lebermetastase des Pankreas carcinoms und eine paratracheale Lymphknotenmetastase des Hautcarcinoms. Sowohl im primären Krebsgewebe wie auch in den metastatischen Absiedelungen lag der Neuraminsäuregehalt beträchtlich über dem des gesunden Vergleichsgewebes. So betrug die Neuraminsäurekonzentration im normalen Pankreasgewebe 45,8 mg/100 g, im Pankreasadenocarcinom lag sie bei 187,0 mg/100 g und in der Lebermetastase bei 75,5 mg/100 g.

Bryant, Stoner und Metzger untersuchten neoplastisch verändertes Lungengewebe von 9 Patienten mit den Diagnosen Adenokarzinom, undifferenziertes Bronchialkarzinom und Plattenepithelkarzinom und wählten als Kontrolle Biopsien aus der weiteren Tumorumgebung; zusätzlich entnahmen sie bei 3 Patienten Biopsien in unmittelbarer Tumornähe (4). Der Neuraminsäuregehalt der Tumorzellen lag mit 55,6 nmol/mg Protein um mehr als das Doppelte höher als der an gesunden tumorfernen Zellen gemessene Neuraminsäurewert von 22,5 nmol/mg Protein. Der Neuraminsäuregehalt der tumornahen Zellen lag mit 31,0 nmol/mg Protein zwischen dem der normalen und der malignen Zellen, was auf einer Infiltration der Tumorumgebung mit malignen Zellen beruhen dürfte.

Es kann also festgehalten werden, daß Versuche an in vivo gewachsenen Tumoren eindeutig für eine erhöhte Neuraminsäurekonzentration der malignen Zelle sprechen. Dabei ist zwar zu beachten, daß die Neuraminsäure nicht ausschließlich in der das Oberflächenverhalten maßgeblich beeinflussenden äußeren Zellmembran vorliegt, sondern zum Teil auch in inneren Membranen und im Cytosol; aus Versuchen mit Neuraminidase kann man jedoch schließen, daß der Großteil (ca. 65 - 75%) der zellulären Neuraminsäure an die äußere Zellmembran gebunden ist (4, 7). Somit kann die Bestimmung des gesamten Neuraminsäuregehalts einer Zelle als gutes Maß für die in der Plasmamembran liegende Neuraminsäure angesehen werden, vor allem dann, wenn Zellen des gleichen Ursprungsgewebes miteinander verglichen werden.

3.3. Neuraminsäurespiegel im Serum Tumorkranker

Einen mehr indirekten Hinweis für eine Zunahme des Neuraminsäuregehalts in Tumorzellen geben Studien, die im

Serum Tumorkranker eine deutliche Erhöhung der Neuraminsäurekonzentration gegenüber dem Normwert, zumindest in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien, aufzeigen konnten. Dabei wird angenommen, daß Tumorzellen vermehrt neuraminsäurehaltige Glykoproteine und Glykolipide freisetzen, die dann in die Blutbahn gelangen.

Silver et al. untersuchten die Neuraminsäurekonzentration von 66 Patienten mit malignem Melanom und verglichen sie mit den Serumwerten von 66 in Alter und Geschlecht angelegenen gesunden Kontrollpersonen (39). Die Melanomapatienten unterteilten sie weiter in drei Gruppen. Gruppe I umfaßte 34 Patienten, die nach Tumorexcision zum Zeitpunkt der Neuraminsäurebestimmung keinerlei Krankheitserscheinungen aufwiesen, Gruppe II umfaßte 13 Patienten mit lokalisiertem Tumor, Gruppe III bestand aus 19 Patienten mit bereits fortgeschrittener Metastasierung. Während die Patienten der Gruppe I in ihrem Neuraminsäurespiegel gegenüber dem Normalkollektiv keine Abweichung zeigten, fanden sich statistisch signifikante Unterschiede sowohl bei Vergleich der Gruppen II und III mit der Kontrollgruppe als auch beim Vergleich der einzelnen Patientengruppen untereinander.

Es zeigte sich, daß die Neuraminsäurekonzentration um so höher lag, je ausgeprägter das Tumorleiden war. Bei Festlegen des oberen Normwertes auf $2,37 \mu\text{mol/ml}$, der doppelten Standardabweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe, wiesen 6% der zur Gruppe I gehörigen Patienten einen erhöhten Neuraminsäurewert auf, während der Anteil der Patienten mit erhöhtem Neuraminsäurespiegel bei der Gruppe II schon 31% und bei der Gruppe III 95% betrug. Ferner konnten die Autoren an 24 Verlaufsstudien zeigen, daß sich bei Zunahme bzw. Abnahme der Tumormasse im Laufe der Therapie auch die Neuraminsäurewerte gleichsinnig änderten.

Vergleichbare Ergebnisse erhielten Herrmann und Gielen bei Bestimmung des Neuraminsäurespiegels im Serum von 49 Melanompatienten; eine hoch signifikante Erhöhung fanden auch sie erst in fortgeschrittenen Tumorstadien (17). Eine Metastasierung in innere Organe führte, vor allem bei Tumorbefall von Lunge und Leber, zu einem starken Neuraminsäureanstieg.

Ebenfalls eine Abhängigkeit der Neuraminsäurekonzentration im Serum vom Tumorstadium konnten Hogan-Ryan, Fennelly et al. bei 65 Patientinnen mit Mammacarcinom nachweisen, wobei die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation erfolgte (19). Eine statistisch signifikante Erhöhung des Neuraminsäurespiegels fand sich erst bei Patientinnen im Stadium III oder IV. Wurde als obere Normwertgrenze für die Serumneuraminsäure die doppelte Standardabweichung vom Mittelwert der gesunden Kontrollpersonen gewählt, so ergab sich in den einzelnen Patientinnengruppen folgender Anteil an Patientinnen mit erhöhten Neuraminsäurewerten:
Stadium I: 1/10, Stadium II: 5/13, Stadium III: 15/23, Stadium IV: 15/19. Wurde je nach Lymphknotenbefall eine weitere Unterteilung der Gruppen II und III in die Stadien IIa und IIIa bzw. IIb und IIIb vorgenommen, so zeigte sich, daß von 10 Patientinnen ohne nachweisbaren Lymphknotenbefall nur 3 einen erhöhten Neuraminsäurespiegel aufwiesen, während dies bei 17 von 26 Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen der Fall war.

Eine gute Korrelation zwischen der Neuraminsäurekonzentration im Serum und dem Erkrankungsverlauf fanden Harvey, Lipton et al. bei 34 Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen (16). Bei 6 Patienten, die einer radikalen operativen Therapie unterzogen wurden, fiel der Neuraminsäurespiegel kurz nach der Operation auf Normalwerte ab. Die anderen Patienten, die eine cytostatische Therapie erhiel-

ten, wurden je nach Ansprechen auf die Chemotherapie in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe umfaßte 4 Patienten, bei denen es zu einer partiellen Remission mit Rückgang der Tumormasse um mehr als 50% kam, geschätzt am Ausmaß der zwei größten metastatischen Läsionen. Diese Patienten zeigten durchwegs einen Abfall ihres Neuraminsäurewertes um mehr als 50%. Bei 7 Patienten mit stationärer Erkrankung, definiert als Abnahme der Tumormasse um weniger als 50% oder Zunahme um weniger als 25%, erfolgte in 6 Fällen ein leichter Abfall, in einem Fall ein Anstieg des Neuraminsäurespiegels. Bei allen 12 Patienten, bei denen es zu einer Zunahme der Tumormasse um mehr als 25% oder zum Auftreten neuer Metastasen kam, nahm auch die Neuraminsäurekonzentration zu, meist um mehr als 50%. Interessant dabei war, daß bei 8 dieser Patienten der Anstieg des Neuraminsäurespiegels dem klinischen Rückfall vorausging.

Horgan untersuchte bei 40 Krebspatienten neben dem Gesamtneuraminsäurespiegel im Serum auch die Konzentration lipidgebundener Neuraminsäure und fand hierbei, daß sich die Bestimmung der lipidgebundenen Neuraminsäure zur Erfassung eines malignen Geschehens noch besser eignet (20). Während bei Messung der Gesamtneuraminsäure eine gewisse Überlappung zwischen Patienten mit malignen Tumoren und Patienten mit benignen Erkrankungen bestand, war dies bei den Werten der lipidgebundenen Neuraminsäure kaum der Fall.

Dnistrian und Schwartz bestimmten ebenfalls die lipidgebundene Neuraminsäure im Serum von 125 Patienten mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen (8). Bei Aufschlüsselung der Werte nach Diagnosen ergab sich in den einzelnen Gruppen folgender Anteil an Patienten mit erhöhter Konzentration der lipidgebundenen Neuraminsäure, wenn man als oberen Grenzwert die doppelte Standardabweichung vom Mittelwert der gesunden Kontrollpersonen festsetzte:

Mammacarcinom: 12/20, Colonicarcinom: 12/18, Bronchialcarcinom: 13/18, Leukämie: 19/21, Lymphom: 14/18, M. Hodgkin: 17/18, Melanom: 10/12. Es zeigte sich somit, daß die lipidgebundene Neuraminsäure vor allem bei Leukämien, Lymphom, M. Hodgkin und Melanom ein ausgezeichneter Tumormarker ist.

3.4. Sialyltransferaseaktivität im Serum Tumorkranker

Einen weiteren indirekten Hinweis für eine Vermehrung der Neuraminsäure in malignen Zellen gibt die Erhöhung der Sialyltransferase im Serum Tumorkranker, des Enzyms, das aktivierte Neuraminsäure in die Oligosaccharidketten der Glykoproteine und Glykolipide einbaut.

Silver et al. untersuchten an 66 Melanompatienten neben dem Neuraminsäurespiegel auch die Sialyltransferaseaktivität im Serum und fanden eine signifikante Erhöhung bei Patienten mit fortgeschrittener Metastasierung; allerdings lag selbst hier nur knapp die Hälfte der Werte eindeutig über der Norm (39).

Ganzinger et al. bestimmten die Sialyltransferase bei 51 Patienten mit verschiedenen Malignomen (13). Wählten sie als oberen Grenzwert die einfache Standardabweichung vom Mittelwert 33 gesunder Personen, so zeigten 80% der Tumorpatienten eine erhöhte Enzymaktivität.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die Bestimmungen des Neuraminsäuregehalts maligner Zellen als auch die Messungen des Neuraminsäurespiegels und der Sialyltransferaseaktivität im Serum Tumorkranker in übereinstimmender Weise für eine Vermehrung der Neuraminsäure in maligne entarteten Zellen sprechen.

3.5. Neuraminsäuregehalt gesunder und maligner Blutzellen

Zur Frage des Neuraminsäuregehalts von Leukämiezellen liegen nur wenige Studien vor.

3.5.1. Gesamter Neuraminsäuregehalt

Mc Clelland und Bridges untersuchten Lymphocytensuspensionen von 25 Patienten mit CLL, 3 Kindern mit ALL sowie 5 Kindern mit ALL im Stadium der kompletten Remission; als Kontrolle dienten Lymphocytensuspensionen 36 gesunder Personen, bei denen ein durchschnittlicher Neuraminsäuregehalt von $0,33 \mu\text{g}/10^6$ Zellen ermittelt wurde(5). Im Vergleich hierzu war der Neuraminsäuregehalt sowohl bei den Patienten mit CLL (Mittelwert: $0,04 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) als auch bei den Kindern mit ALL (Einzelwerte: $0,09$, $0,04$, $0,02 \mu\text{g}/10^6$ Zellen) stark vermindert. Die Neuraminsäurewerte der Kinder, die sich in voller Remission befanden, lagen dagegen annähernd im Normbereich (Einzelwerte: $0,53$, $0,42$, $0,17$, $0,24$, $0,39 \mu\text{g}/10^6$ Zellen).

Steimer und Despont untersuchten Leukämiezellen von CLL-Patienten, T-Lymphocyten aus dem Blut Gesunder sowie B-Lymphocyten aus Tonsillen Gesunder und fanden folgende Werte für ihre Gesamtneuraminsäure: T-Lymphocyten: $19,1$, B-Lymphocyten: $10,2$, CLL-Lymphocyten: $20,7 \text{ nmol}/10^8$ Zellen (42). Berücksichtigt man die Tatsache, daß die chronisch lymphatische Leukämie in ca. 97% der Fälle eine B-Zell-Leukämie ist, so besteht zwischen den Lymphocyten der CLL-Patienten und den gesunden B-Lymphocyten ein statistisch signifikanter Unterschied im Sinne eines erhöhten Neuraminsäuregehalts der Leukämiezelle gegenüber der gesunden Ausgangszelle.

Keinen Unterschied zwischen gesunden B-Zellen und den Lymphocyten von 9 CLL-Patienten konnten dagegen O'Kennedy, Smyth et al. feststellen (22). Mit Hilfe von Rosettenbildung und anschließender Zentrifugation gewannen sie aus Lymphocytensuspensionen Gesunder eine B-Zellfraktion und eine T-Zellfraktion. Auch sie fanden, daß der Neuraminsäuregehalt der T-Zellen mit einem Wert von $348 \text{ nmol}/10^9$ Zellen wesentlich über dem der B-Zellen mit einem Wert von $95 \text{ nmol}/10^9$ Zellen lag. Der Neuraminsäuregehalt der CLL-Lymphocyten betrug durchschnittlich $88 \text{ nmol}/10^9$ Zellen und glich damit annähernd dem an gesunden B-Lymphocyten erhaltenen Wert. Dieses Ergebnis führten die Autoren auf die B-Zell-Natur der Lymphocyten bei CLL zurück.

Angesichts dieser stark divergierenden Befunde läßt sich nur feststellen, daß hinsichtlich des Gesamtneuraminsäuregehalts von Leukämiezellen keine klaren Aussagen möglich sind.

3.5.2. Neuraminsäuregehalt der Zelloberfläche

Ein noch genaueres Maß für die an der Zelloberfläche lokalisierte Neuraminsäure, als es die Bestimmung des gesamten Neuraminsäuregehalts einer Zelle darstellt, ist die Bestimmung des Neuraminsäureanteils, der sich durch Einwirken des Enzyms Neuraminidase von der Zelle ablösen läßt. Dabei wird eine bestimmte Zellzahl mit Neuraminidase inkubiert; anschließend wird die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand auf Neuraminsäure untersucht. Da das Neuraminidasemolekül aufgrund seiner Größe nicht durch die Poren der Zellmembran diffundieren kann, befreit Neuraminidase nur die in der äußeren Zellmembran lokalisierte Neuraminsäure aus ihrer glykosidischen Bindung.

Reed et al. fanden, daß sich aus Lymphocytensuspensionen 9 gesunder Kontrollpersonen 12,9 nmol Neuraminsäure/ 5×10^7 Zellen freisetzen ließen, während leukämische Lymphoblasten von 10 Patienten mit ALL nur 6,9 nmol Neuraminsäure/ 5×10^7 Zellen an das umgebende Flüssigkeitsmedium abgaben (32).

Ebenfalls einen erniedrigten Neuraminsäureanteil in der Zellmembran leukämischer Lymphoblasten fanden Hogan-Ryan und Fennelly (18). Sie erhielten an gesunden Lymphocyten (22 Kontrollpersonen) einen Wert von 218 ± 79 nmol/ 10^9 Zellen, bei leukämischen Lymphoblasten betrug dieser Wert nur 172 ± 28 nmol/ 10^9 Zellen; allerdings ist hier aufgrund der breiten Streuung der Normalwerte keine klare Abgrenzung der beiden Kollektive gegeben.

O'Kennedy und Smyth differenzierten in ihren Untersuchungen Lymphocytensuspensionen Gesunder in B-Zellen und T-Zellen und fanden hierbei, daß die Zellmembran normaler B-Lymphocyten (54 nmol/ 10^9 Zellen) wesentlich weniger Neuraminsäure enthielt als die Zellmembran normaler T-Lymphocyten (270 nmol/ 10^9 Zellen) (22). Bei einem Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie ließen sich durch Neuraminidase aus der Zelloberfläche der leukämischen Lymphoblasten 132 nmol Neuraminsäure/ 10^9 Zellen freisetzen. Der Anteil an Neuraminsäure lag also in der Zellmembran der Leukämiezellen deutlich niedriger als in der Zellmembran ihrer gesunden Ausgangszellen, der T-Lymphocyten.

O'Kennedy und Smyth untersuchten weiterhin Lymphocyten aus dem Blut von 9 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und konnten zeigen, daß bei den leukämischen Zellen der Neuraminsäuregehalt in der Zelloberfläche (64 nmol/ 10^9 Zellen) annähernd dem gesunder B-Lymphocyten glich (54 nmol/ 10^9 Zellen) (22).

Hogan-Ryan und Fennelly inkubierten Lymphocytensuspensionen Gesunder (22 Kontrollpersonen) sowie Lymphocytensuspensionen von 10 CLL-Patienten mit Neuraminidase und fanden, daß sich von den leukämischen Zellen weniger Neuraminsäure abspalten ließ (158 nmol/10⁹ Zellen) als von den gesunden Lymphocyten (218 nmol/10⁹ Zellen) (18). Da sie bei ihrem Versuch nicht zwischen B- und T-Lymphocyten unterschieden, könnte die höhere Neuraminsäurekonzentration der normalen Lymphocytensuspensionen allein auf ihren hohen T-Zellgehalt zurückzuführen sein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß CLL-Lymphocyten und ihre gesunden Vergleichszellen, die B-Lymphocyten, etwa gleich viel Neuraminsäure in ihrer Zelloberfläche aufweisen, während der Neuraminsäuregehalt in der Zellmembran leukämischer Lymphoblasten bei ALL gegenüber dem gesunden T-Lymphocyten deutlich herabgesetzt ist.

3.6. Neuraminsäuregehalt in Oberflächenglykoproteinen

Eine Vermehrung der Neuraminsäure in den Oberflächen-glykoproteinen maligne transformierter BHK₂₁/C₁₃ Zellen im Vergleich zu ihren gesunden Ausgangszellen fanden Warren, Fuhrer und Buck (43). Nachdem sie die Glykoproteine der gesunden bzw. der transformierten Zellen mit Hilfe von L-C¹⁴-Fucose bzw. L-H³-Fucose radioaktiv markiert hatten, gewannen sie die Oligosaccharidketten der Glykoproteine durch Einwirken von Trypsin und Pronase. Bei anschließender chromatographischer Untersuchung zeigte sich, daß die Zuckerreste der transformierten Zellen schneller eluierten als die der gesunden Zellen und somit ein erhöhtes Molekulargewicht aufwiesen. Wurden die Zellen vor der Abspaltung ihrer Oligosaccharidketten mit Neuraminidase inkubiert, so glichen sich die

Elutionsprofile der gesunden und der transformierten Zellen. Der Unterschied in den Glykoproteinen gesunder und maligne transformierter Zellen ließ sich also allein auf einen erhöhten Neuraminsäuregehalt in den Zuckerresten der transformierten Zellen zurückführen.

Zu dem gleichen Ergebnis, gewonnen an verschiedenen Zelllinien, kamen van Beek, Smets und Emmelot (2). Ausgehend von der Beobachtung, daß leukämische Lymphblasten der Maus in ihren Oberflächenglykoproteinen mehr Neuraminsäure enthielten als gesunde Mäuselymphocyten, gelang es ihnen, diese Veränderung auch an menschlichen Leukämiezellen nachzuweisen (3). Neben Lymphocyten gesunder Kontrollpersonen untersuchten sie Leukämiezellen von Patienten mit folgenden Diagnosen: ALL, ALL, CLL, CLL, AML, AML, CML, CML, akute Promyelocytenleukämie, akute myelomonocytäre Leukämie. Bei allen Leukämiepatienten ließ sich anhand der Elutionsprofile ein erhöhtes Molekulargewicht der an Oberflächenglykoproteine gebundenen Oligosaccharidketten aufzeigen. Mit Ausnahme der beiden CML-Patienten ließ sich in allen weiteren Fällen durch vorherige Neuraminidaseinkubation das Elutionsmuster der Zuckerreste normalisieren. Auch hier war also das erhöhte Molekulargewicht der Oligosaccharidketten durch eine Vermehrung der Neuraminsäure bedingt.

3.7. Vergleich mit eigenen Ergebnissen

Versucht man nun, die Heparin abstoßende Eigenschaft der malignen Zelle mit einer Zunahme ihres Neuraminsäuregehalts zu erklären, so stößt man auf ähnliche Probleme wie bei der Bewertung zellelektrophoretischer Untersuchungen.

Während offenbar alle malignen Zellen aus soliden Tumoren einen erhöhten Neuraminsäuregehalt aufweisen, sind auch hier die an Leukämiezellen gewonnenen Ergebnisse sehr widersprüchlich.

Der feinste Parameter zur quantitativen Erfassung der an der Zelloberfläche lokalisierten Neuraminsäure, die Neuraminsäuremenge, die sich durch Neuraminidase von der Zellmembran ablösen läßt, zeigt bei leukämischen Lymphoblasten von ALL-Patienten sogar eine deutliche Verminderung im Vergleich zu gesunden Lymphocyten. Bei CLL-Lymphocyten dagegen scheint die Neuraminsäurekonzentration in der Zellmembran gegenüber den gesunden Ausgangszellen, den B-Lymphocyten, unverändert zu sein.

Die oben beschriebenen Versuche van Beeks, Smets und Emmelots zeigen zwar eine Vermehrung der Neuraminsäure in Oberflächenglykoproteinen von Leukämiezellen, können aber keine quantitative Aussage machen, da die Neuraminsäure nicht ausschließlich an die untersuchten Glykoproteine gebunden ist.

Man könnte nun vermuten, daß die Heparin abweisende Eigenschaft maligner Zellen und ihr Neuraminsäuregehalt keine Beziehung zueinander aufweisen. Gegen diese Vermutung sprechen jedoch die eigenen Versuche an ALL-Lymphoblasten, die nach Neuraminidaseinkubation Heparin ebenso dicht an ihre Zelloberfläche anlagerten wie gesunde Blutzellen.

IV. Zusammenfassung

Peripheres Blut und Knochenmark von 10 Kindern mit ALL, 3 Kindern mit Neuroblastom, einem Kind mit Monocyten-leukämie sowie einer Patientin mit CLL wurden mit Heparin inkubiert und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff 9-Aminoacridinhydrochlorid gefärbt. Als Kontrolle dienten Blut- und Knochenmarkproben von 70 Kindern, bei denen keine malignen Erkrankungen vorlagen.

Bei mikroskopischer Betrachtung der Blut- und Knochenmarkausstriche zeigte sich, daß alle gesunden Blut- und Knochenmarkszellen das Polyanion Heparin als fluoreszierenden Heparin-Farbstoffkomplex dicht an ihre Zelloberfläche anlagerten, die Mehrzahl der malignen Zellen dagegen ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber Heparin aufwies. Zwar war noch eine deutliche Beziehung zwischen der Zelloberfläche und den Heparin-Farbstoffkomplexen erkennbar, die Anlagerung erfolgte jedoch in geringerem Ausmaß und in größerem Abstand zur Zellmembran.

Diese Heparin abweisende Eigenschaft der malignen Zellen konnte durch vorangehende Neuraminidaseinkubation aufgehoben werden, was auf eine erhöhte Neuraminsäuredichte in der Zellmembran maligner Zellen als Ursache für das veränderte Oberflächenverhalten hinweist.

V. Literaturverzeichnis

1. Ambrose EJ, James AM, Lowick JH (1956): Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumor cells. *Nature Dis. J.* 177: 576-577
2. Van Beek WP, Smets LA, Emmelot P (1973): Increased sialic acid density in surface glycoproteins of transformed and malignant cells - a general phenomenon? *Cancer Res.* 33: 2913-2922
3. Van Beek WP, Smets LA, Emmelot P (1975): Changed surface glycoprotein as a marker of malignancy in human leukaemic cells. *Nature* 253: 457-460
4. Bryant ML, Stoner GD, Metzger RP (1974): Protein bound carbohydrate content of normal and tumorous human lung tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 343: 226-231
5. McClelland DA, Bridges JM (1973): The total N-acetyl neuraminic acid content of human normal and lymphatic leukaemic lymphoblasts. *Br. J. Cancer* 27: 114-119
6. Cook GMW, Heard DH, Seaman GJV (1961): Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature* 191: 44-47
7. Cook GMW, Jakobson W (1968): The electrophoretic mobility of normal and leukemic cells of mice. *Biochem. J.* 107: 549-557

8. Dnistrian AM, Schwartz MK (1981): Plasma lipid-bound sialic acid and carcinoembryonic antigen in cancer patients. Clin. Chem. 27: 1737-1739
9. Emmelot P (1973): Biochemical properties of normal and neoplastic cell surfaces; a review. Europ. J. Cancer 9: 319-333
10. Emmelot P, Bos CJ (1972): Studies on plasma membranes. XVII. On the chemical composition of plasma membranes prepared from rat and mouse liver and hepatomas. J. Membrane Biol. 9: 83-104
11. Forrester JA, Ambrose EJ (1962): Electrophoretic investigation of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population. Nature 196: 1068-1070
12. Furchgott RH, Ponder E (1941): Electrophoretic studies on human red cells. J. Gen. Physiol. 24: 447-457
13. Ganzinger U, Dorner F, Unger FM, Moser K, Jentzsch K (1977): Erhöhung der Serum-Sialyltransferase bei menschlichen Malignomen: Grundlage für ein neues Diagnostikum? Klin. Wschr. 55: 553-555
14. Grimes WJ (1970): Sialic acid transferases and sialic acid levels in normal and transformed cells. Biochemistry 9: 5083-5092
15. Hartmann JF, Buck CA, Defendi V, Glick MC, Warren L (1972): The carbohydrate content of control and virus-transformed cells. J. Cell. Physiol. 80: 159-166

16. Harvey HA, Lipton A, White D, Davidson E (1981): Glycoproteins and human cancer: II. Correlation between circulating level and disease status. *Cancer* 47: 324-327
17. Herrmann WP, Gielen W (1980): Klinische Bedeutung der Sialinsäurekonzentration im Serum von Melanompatienten. *Der Hautarzt* 31: 184-187
18. Hogan-Ryan A, Fennelly JJ (1978): *Vibrio cholerae* neuraminidase susceptible N-acetyl neuraminic acid (sialic acid) levels in human leukaemia. *Ir. J. Med. Sci.* 147: 308-312
19. Hogan-Ryan A, Fennelly JJ, Jones M, Cantwell B, Duffy MJ (1980): Serum sialic acid and CEA concentrations in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 41: 587-592
20. Horgan IE (1982): Total and lipid-bound sialic acid levels in sera from patients with cancer. *Clin. Chim. Acta* 118: 327-331
21. Keenan TW, Morré DJ (1973): Mammary carcinoma: enzymatic block in disialoganglioside biosynthesis. *Science* 182: 935-936
22. O'Kennedy R, Smyth H, Corrigan A, Clynes M (1982): Total and surface-located sialic acid levels in normal and leukemic lymphocytes: relationship to T and B cell nature and to location in vivo. *Europ. J. Cancer Clin. Oncol.* 18: 437-446
23. Kimura A, Nagai Y, Turumi KI (1961): Hexosamine and sialic acid content in cells. *Nature* 191: 596

24. Kloppel TM, Morré DJ (1980): Characteristics of transplantable tumors induced in the rat by N-2-fluorenylacetamide: elevations in tissue and serum sialic acid. JNCI 64: 1401-1411
25. Köttgen E, Bauer Ch, Reutter W, Gerok W (1979): Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen Bedeutung von Glycoproteinen. Klin. Wschr. 57: 151-159
26. Lichtman MA, Weed RI (1970): Electrophoretic mobility and N-acetyl neuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes. Blood 3: 12-22
27. Mabry EW, Carubelli R (1971): Sialic acid in human cancer. Experientia 28: 182-183
28. Nordling St, Andersson LC, Hävry P (1972): Thymus-dependent and thymus-independent lymphocyte separation: relation to exposed sialic acid on cell surface. Science 178: 1001-1002
29. Ohta N, Pardee AB, Mc Auslin BR, Burger MM (1968): Sialic acid contents of normal and malignant cells. Biochim. Biophys. Acta 158: 98-102
30. Perdue JF, Kletzien R, Wray VL (1971): The isolation and characterization of plasma membrane from cultured cells. IV. The carbohydrate composition of membranes isolated from oncogenic RNA virus-converted chick embryo fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 266: 505-510

31. Purdom L, Ambrose EJ, Klein G (1958): A correlation between electrical surface charge and some biological characteristics during the stepwise progression of a mouse sarcoma. *Nature* 181: 1586-1587
32. Reed RC, Gutterman JU, Mavligit GM, Hersh EM (1974): Sialic acid on leukemia cells: relation to morphology and tumor immunity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145: 790-793
33. Rueff F (1964): Die Zellelektrophorese in der klinischen Diagnostik. *Hämatologie und Bluttransfusion*, Bd. 3, J.F. Lehmann Verlag, München
34. Ruhenstroth-Bauer G, Straub E, Sachtleben P, Fuhrmann G (1961): Die elektrophoretische Beweglichkeit von Blutzellen beim Gesunden und bei Kranken. *Münch. med. Wschr.* 103: 794-797
35. Sabolovic D, Sabolovic N, Dumont F (1972): Identification of T and B cells in mouse and man. *The Lancet*: 972
36. Sabolovic D, Pompidou A, Amiel JL (1975): Blood lymphocytes in acute lymphoid leukemia in remission and relapse. Predictive value of electrophoretic mobility and refringence. *Biomedicine* 23: 283-290
37. Sabolovic D, Sabolovic N, Amiel JL (1978): Electrophoretic mobility of lymphocytes in leukemia. *The Lancet*: 335
38. Schauer R (1973): Chemie und Biologie der Acylneuraminsäuren. *Angew. Chem.*, 85. Jahrg., Nr. 3, 128-139

39. Silver HKB, Karim KA, Archibald EL, Salinas FA (1979): Serum sialic acid and sialyltransferase as monitors of tumor burden in malignant melanoma patients. *Cancer Res.* 39: 5036-5042
40. Smith BA, Ware BR, Weiner RS (1976): Electrophoretic distribution of human peripheral blood mononuclear white cells from normal subjects and from patients with acute lymphocytic leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 2388-2391
41. Smith BA, Ware BR, Yankee RA (1978): Electrophoretic mobility distributions of normal T and B lymphocytes and of peripheral blood lymphoblasts in acute lymphocytic leukemia: Effects of neuraminidase and of solvent ionic strength. *J. Immunol.* 120: 921-926
42. Steimer F, Despont JP (1980): Cell surface changes in human normal and abnormal lymphoid cells detected by sialic acid content and sialyltransferase activity. *Leuk. Res.* 4: 265-269
43. Warren L, Fuhrer JP, Buck CA (1972): Surface glycoproteins of normal and transformed cells: a difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyl transferase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69: 1838-1842
44. Yogeewaran G, Salk PL (1981): Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines. *Science* 212: 1514-1516

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Suschke danke ich herzlich
für die Überlassung des Themas und die hilfsbereite,
verständnisvolle Betreuung.

Lebenslauf

Am 26. April 1958 wurde ich als zweites Kind des Bundesbankbeamten Georg Brosse und seiner Ehefrau Edith geb. Michl in Miltenberg am Main geboren.

Von 1964 - 1968 besuchte ich die Volksschule der Englischen Fräulein, Maria-Ward-Straße, in München. Im Herbst 1968 trat ich in das Neusprachliche Louise-Schröder-Gymnasium ein, an dem ich im Juni 1977 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Vom Wintersemester 1977 bis zum Sommersemester 1984 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Medizin.

Die Approbation als Arzt erhielt ich am 18. Mai 1984.

